

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-142776
(P2002-142776A)

(43) 公開日 平成14年5月21日 (2002. 5. 21)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード*(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 1/21	4 B 0 2 4
1/21		9/16	Z 4 B 0 5 0
9/16		(C 1 2 N 1/21	4 B 0 6 5
// (C 1 2 N 1/21		C 1 2 R 1:01)	
C 1 2 R 1:01)		C 1 2 N 15/00	Z N A A
		審査請求 未請求 請求項の数7	O L (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2000-348115(P2000-348115)

(22) 出願日 平成12年11月15日 (2000. 11. 15)

(71) 出願人 000112060
ヒゲタ醤油株式会社
東京都中央区日本橋小網町2番3号
(72) 発明者 小澤 良
千葉県銚子市三軒町6-14
(72) 発明者 花方 寛
千葉県銚子市清川町4-5-1
(72) 発明者 恵比須 省吾
千葉県銚子市清水町2798-1
(74) 代理人 100075775
弁理士 戸田 親男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 耐熱性のヌクレアーゼ活性を有する蛋白質

(57) 【要約】

【解決手段】 耐熱性を有する新規ヌクレアーゼ遺伝子のクローニングが行われ、その塩基配列も決定された。また、このクローニングされた上記の新規遺伝子をベクターに挿入することにより宿主を形質転換した。

【効果】 この形質転換体を培養することにより、耐熱性を有する新規ヌクレアーゼを大量に生産することが可能となった。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号4のアミノ酸配列で示される蛋白質。

【請求項2】 該蛋白質が耐熱性のヌクレアーゼ活性を有するものであることを特徴とする請求項1に記載の蛋白質。

【請求項3】 配列表の配列番号1の塩基配列で示され、請求項1又は2に記載の蛋白質をコードする遺伝子を含むDNA。

【請求項4】 請求項3に記載のDNAを含有してなる組換えベクター。

【請求項5】 請求項4に記載の組換えベクターにより形質転換された形質転換体ブレヴィバチルス・チョウシネンシス (*Brevibacillus choshinensis* HPD31-S5/pNH300 ph1212 (FERM P-18071))。

【請求項6】 請求項5に記載の形質転換体を培養し、培養物中に該蛋白質を生成蓄積させ、この該蛋白質を採取すること、を特徴とする請求項1又は2に記載の蛋白質の製造方法。

【請求項7】 下記の理化学的性質を有すること、を特徴とする耐熱性ヌクレアーゼ。

(1) 作用

カルシウムイオンの存在下、ポリヌクレオチドを加水分解して、3'-ヌクレオチドを主に生成する。

(2) 基質特異性

エンド型ヌクレアーゼであって、スタフィロコッカルヌクレアーゼに近似した性質を有する。

(3) 至適温度

80℃以上

(4) 至適pH及び安定pH範囲

pH8~10で安定であり、酵素活性の至適pHは9.5である。

(5) 熱安定性及び有機溶媒中での反応性

本酵素は、60~100℃においても安定であり、pH9.5、95℃で1時間加熱しても80%の活性を保持し、20%エタノールの存在下、pH6.0、60℃の反応で、溶媒非存在下の77%の活性を保持する。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、耐熱性のヌクレアーゼ活性を有する蛋白質に関する。より詳細には、パイロコッカス属に属する超好熱性細菌由来の耐熱性のスタフィロコッカルヌクレアーゼ様活性(カルシウムイオン要求性ヌクレアーゼ活性)を有する蛋白質に関する。

【0002】

【従来の技術】ヌクレアーゼは細胞粗抽出液中の核酸成分の加水分解、ヌクレオソームの調製、クロマチンの構造解析などに有用な酵素である。ヌクレアーゼの加水分解反応は基質を構成するホスホジエステル結合の結合位置に特異的であり、このうち特にカルシウムイオン要求

性のスタフィロコッカルヌクレアーゼはポリヌクレオチド加水分解反応において、3'-ヌクレオチドを主要分解物とする。

【0003】今までに基質特異性の異なる種々のヌクレアーゼが細菌や植物から発見されているが、多くが常温生物由来のため、耐熱性に乏しく、有機溶媒等も併用される苛酷な合成反応には不適當であった。

【0004】耐熱性であり、かつ有機溶媒中で活性を有するヌクレアーゼが発見されれば、有機溶媒の存在下で優先される加水分解反応の逆反応つまり合成反応を用い、選択性の高いホスホジエステルの合成反応に生体触媒を用いる新手法の開発が可能と考えられる。また、このような安定な性質を有するヌクレアーゼを固定化酵素にすれば、繰り返し使用も可能である。従って、極限環境下で活性を有するヌクレアーゼが渴望されていた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、耐熱性のヌクレアーゼ活性を有する酵素を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記現状に鑑み、各方面から検討した結果、耐熱性を有する新規ヌクレアーゼを開発するためには遺伝子工学的手法によるのが最適であるとの観点にたった。そこで本発明者らは、90~100℃で生育する超好熱性細菌に着目し、そして鋭意研究の結果、その遺伝子配列から本酵素活性を示すタンパク質をコードすると推測される遺伝子を見出した。さらに、その遺伝子配列のうち、mature配列と推測される配列(図2、配列番号3)をブレヴィバチルス・チョウシネンシス (*Brevibacillus choshinensis*) に組み込んで、この形質転換されたブレヴィバチルス・チョウシネンシスを使ってその遺伝子から酵素を分泌生産し、この酵素が高温(95℃以上)で安定に存在し、且つ、カルシウムイオンの濃度依存的にヌクレアーゼ活性を示すことを確認し、耐熱性を有し安定性のすぐれた新規ヌクレアーゼ製造に関するトータルシステムの構築に成功し、遂に発明の完成に至ったものである。

【0007】すなわち本発明は、耐熱性にすぐれた安定性の高い新規ヌクレアーゼを提供するものであって、例えば配列表の配列番号4に示されるアミノ酸配列からなり且つ耐熱性のヌクレアーゼ活性を有する蛋白質を提供するものである。本発明においてヌクレアーゼ活性を有する蛋白質にはヌクレアーゼも包含されるものであって、以下において、前者も単にヌクレアーゼということもある。

【0008】また、本発明は、ヌクレアーゼ遺伝子を新たに提供するものであって、本発明に係る遺伝子は、ヌクレアーゼをコードする遺伝子、ヌクレアーゼ酵素活性を有する遺伝子、これらの遺伝子の少なくともひとつを含有する遺伝子、から選ばれる少なくともひとつを指す

ものであり（以下、単にヌクレアーゼ遺伝子ということもある）、例えば配列表の配列番号1の塩基配列で示されるDNAが例示される。

【0009】更に、本発明は、上記のDNAを含む組換えベクター、この組換えベクターにより形質転換された形質転換体、及び該蛋白質をコードするDNAを含む発現ベクターにより形質転換された形質転換体を培養し、次いで培養物中に該蛋白質を生成蓄積せしめ、この培養物より該蛋白質を採取することに関するものである。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明に係る酵素は、耐熱性のヌクレアーゼ活性を有する点で特徴的であり、硫黄代謝好熱性古細菌パイロコッカス・ホリコシJCM 9974に由来するものである。以下、製造方法の一例を例にとって、本発明を具体的に説明する。

【0011】まず、ヌクレアーゼ遺伝子をクローニングするため、パイロコッカス・ホリコシ（英文名Pyrococcus horikoshii）を例えばGonzalezらの方法（Gonzalez, Juan M. et al., Extremophiles, 2, 123(1998)）により培養した後、周知の技術、例えば、Saito and Miuraの方法により染色体DNAを調製する。次いで、染色体DNAを制限酵素により断片化し、例えばBacベクター（Novagen社製）を用いてゲノムDNAライブラリーを作製する。パイロコッカス・ホリコシの染色体をカバーするクローンを選択し、各々について部分的な塩基配列を決定、比較することによりクローンの整列化を行う。整列化されたクローンのDNAを断片化し、この断片を用いて周知の技術、例えば、ショットガンクローニング法によりクローンを作製する。各ショットガンクローンの塩基配列を自動塩基配列読みとり装置を用いて決定する。得られた塩基配列を連結編集し、クローンの全塩基配列を決定する。クローンの全塩基配列の大型計算機による解析を行い、ヌクレアーゼをコードする遺伝子を同定する。こうして同定されたヌクレアーゼをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号1（図1）に示す。

【0012】本発明に用いた組換えヌクレアーゼ（PH1212）のポリペプチドは、分泌形態または非分泌形態のいずれで生産されてもよいが、分離精製の容易さから分泌形態が好ましい。分泌形態の場合、該ポリペプチドをコードするDNAの上流に任意のシグナルペプチドをコードするDNA配列を連結させる。発現ベクターとしては、バチルス属細菌やブレヴィバチルス属細菌において自律複製可能であって、目的DNAの転写が可能な位置にプロモーターを含有している物を選択でき、または、染色体中へ直接組み込み、発現させることでもよい。宿主細胞としては、バチルス属細菌やブレヴィバチルス属細菌、特にブレヴィバチルス・チョウシネンシスが良好に使用できる。形質転換法としては、エレクトロポレーション法、プロトプラスト法、トリスPEG法などを用いることができる。

【0013】このヌクレアーゼをコードする遺伝子をPCR反応で増幅し抽出した後、発現プラスミド（例えば、pNH300TP17（バチルス・プレビス（*Bacillus brevis*）HPD31/pNH300TP17（FERM BP-5641）として寄託））または宿主細胞（例えば、ブレヴィバチルス・チョウシネンシス）の染色体に挿入し、形質転換された形質転換体を培地中に培養して、発現ベクターに組込まれた目的DNAや染色体に組込まれた目的DNAを発現させ、生産された蛋白質を加熱処理およびカラムクロマトグラムで分離精製することができる。

【0014】精製された当該蛋白質は、アミノ酸残基数147からなる分子量約17,000の蛋白質で、カルシウムイオンの濃度に依存してヌクレオチドを加水分解する酵素であることがわかった。この蛋白質は10mM CaCl_2 、100mM NaCl を含む50mMグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液（pH9.5）中で95℃で1時間処理しても、80%の活性が保持されていた。また、活性の至適pHは9.5で、至適温度はpH9.5で80℃以上であった。

【0015】本発明の耐熱性のヌクレアーゼは、ヌクレオチドの加水分解、ヌクレオソームの調製、クロマチンの構造解析などに利用することができる。

【0016】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明する。これらの実施例は説明のためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

【0017】（実施例1）菌の培養

パイロコッカス・ホリコシJCM9974（理化学研究所微生物系統保存施設より入手）は次の方法で培養した。13.5gの食塩、4gの Na_2SO_4 、0.7gの KCl 、0.2gの NaHCO_3 、0.1gの KBr 、30mgの H_3BO_3 、10gの $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、1.5gの CaCl_2 、25mgの SrCl_2 、1.0mLのレザスリン溶液（0.2g/L）、10gの酵母エキス、5gのバクトペプトンを1Lに溶かし、この溶液のpHを6.8に調整し加圧殺菌した。ついで、乾熱滅菌した元素硫黄を0.2%となるように加え、この培地をアルゴンで飽和して嫌気性とした後、JCM9974を植菌した。培地が嫌気性となったか否かは Na_2S 溶液を加えて、培養液中で Na_2S によるレザスリン溶液のピンク色が着色しないことにより確認した。この培養液を95℃で2～4日培養し、その後遠心分離し集菌した。

【0018】（実施例2）染色体DNAの調製

パイロコッカス・ホリコシJCM9974の染色体DNAは以下の方法により調製した。培養終了後5000rpm、10分間の遠心分離により菌体を集菌した。菌体を10mM Tris（pH7.5）1mM EDTA溶液で2回洗浄後InCert Agarose（FM

C社製)ブロック中に封入した。このブロックを1%N-lauroyl sarcosine、1mg/mlプロテアーゼK溶液中で処理することにより、染色体DNAをAgaroseブロック中に分離調製した。

【0019】(実施例3)染色体DNAを含むライブラリークローンの作製

実施例2で得られた染色体DNAを制限酵素HindIIにより部分分解後アガロースゲル電気泳動により約40kb長の断片を調製した。このDNA断片と制限酵素HindIIによって完全分解したBacベクターpBAC108L及びpFOS1とをT4リガーゼを用いて結合させた。前者のベクターを用いた場合には結合終了後のDNAをただちに大腸菌内へエレクトロポレーション法により導入した。後者のベクターpFOS1を用いた場合には結合終了後のDNAをGIGA Pack Gold (ストラタジーン社製)により試験管内でλファージ粒子内に詰め込み、この粒子を大腸菌に感染させることによりDNAを大腸菌内に導入した。これらの方法により得られた抗生物質クロラムフェニコール耐性の大腸菌集団をBAG及びFosmidライブラリーとした。ライブラリーからJCM9974の染色体をカバーするのに適したクローンを選択して、クローンの整列化を行った。

【0020】(実施例4)各BAG或いはFosmidクローンの塩基配列決定

整列化されたBAG或いはFosmidクローンについて順次以下の方法で塩基配列を決定していった。大腸菌より回収した各BAG或いはFosmidクローンのDNAを超音波処理することにより断片化し、アガロースゲル電気泳動により1kb及び2kb長のDNA断片を回収した。この断片をプラスミドベクター、pUC118のHindII制限酵素部位に挿入したショットガンクローンを各BAG或いはFosmidクローン当たり500クローン作製した。各ショットガンクローンの塩基配列をパーキンエルマー、ABI社製自動塩基配列読み取り装置373または377を用いて決定していった。各ショットガンクローンから得られた塩基配列を塩基配列自動連結ソフトSequencherを用いて連結編集し、各BAG或いはFosmidクローンの全塩基配列を決定していった。

【0021】(実施例5)ヌクレアーゼ遺伝子の同定
上記で決定された各BAG或いはFosmidクローンの塩基配列の大型計算機による解析を行い、ヌクレアーゼをコードする遺伝子(配列番号1、図1の上段)を同定した。なお、配列番号1に示すヌクレアーゼ遺伝子の全塩基配列に対応するアミノ酸配列(ヌクレアーゼ酵素活性を有する蛋白質、その中にヌクレアーゼを含有する)を配列番号2(図1の下段)に示す。

【0022】

(実施例6)ヌクレアーゼ遺伝子のクローン化

(1)大腸菌へのクローニング

構造遺伝子領域の前後に制限酵素(NcoIとBamHI)サイトを構築する目的でパイロコッカス・ホリコシ染色体DNAをテンプレートにして合成した2種類のプライマーPH1212N(図3、配列番号5)、PH1212C(図3、配列番号6)を合成し、PCRでその遺伝子の前後に制限酵素サイトを導入し、パイロコッカス・ホリコシのヌクレアーゼ遺伝子(図1、配列番号1)の一部(ph1212:図1の88~528番目までのポリヌクレオチド:441bp)をPCR法で増幅した(図2の上段、配列番号3)。なお、配列番号3に示すヌクレアーゼ遺伝子(ph1212)に対するアミノ酸配列(PH1212)を配列番号4(図2の下段)に示す。このアミノ酸配列は、ヌクレアーゼ酵素活性を有するものである。

【0023】ph1212遺伝子の取得はPCR法によって行った。すなわち、プライマーPH1212NとプライマーPH1212Cを各々100pmol、Taqポリメラーゼ(宝酒造製)2.5単位、dNTP(宝酒造製)200μM、パイロコッカス・ホリコシOT3鋳型DNA 1ng、100μlTaq緩衝液(10mMトリス-塩酸(pH8.5)、2.5mM Mg²⁺、50mM塩化カリウム、100μg/mlウシ血清アルブミン)を混合し、96℃で30秒保持した後、DNAの熱変性(94℃、60秒)、プライマーのアニーリング(54℃、60秒)、プライマーの伸長(70℃、60秒)を25サイクルさせることによって増幅させた。

【0024】遺伝子ph1212(441bp)を、0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、断片を回収した。プラスミドpT7 Blue(Novagen社製)と先に得たph1212遺伝子断片をT4DNAリガーゼ(宝酒造製)を用いて連結した。連結DNAを大腸菌JM109に形質転換し、アンピシリン50mg/ml含有LB寒天培地(1.0%Tryptone、0.5%Yeast Extract、1.0%NaCl、1.5%寒天、pH7.0)に塗布して、アンピシリン耐性を持つ株を選択した。選択株よりプラスミドを抽出してph1212遺伝子を保持するプラスミドpT7 Blue ph1212を得た。また、ここで得た株をE. coli JM109/pT7 Blue ph1212とした。

【0025】

(2)ヒスタグ化クローニングベクターの構築

目的蛋白質の抗原抗体反応での検出と精製を容易にする目的で、目的蛋白質のC末端側にヒスタグ配列を付加させるヒスタグ化クローニングベクターの構築をおこなった。ベクターの構築は以下のように行った。

【0026】バチルス・プレビスHPD31/pNH300TP17(FERM BP-5641)をネオマイシン50μg/ml含有TM寒天培地(1%ペプトン、

0.2%酵母エキス、0.5%肉エキス、1%グルコース、0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.001% $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.0001% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1.5%寒天、pH7.0)で培養し、プラスミドを抽出して精製した後、BamHI (宝酒造製)とHindIII (宝酒造製)で処理し、0.8%アガロースゲル電気泳動に供して4.0kbpの断片を回収した。さらに、ベクターのBamHIとHindIII部位にヒスタグ配列を含むリンカーDNAを挿入する目的で、上流末端にBamHI部位を下流末端にHindIII部位を形成するためのヒスタグ配列 (Sisk, W.P. et al., J. Virol., 68, 766(1994))を含む合成DNA 2種 (His-1: 図4、配列番号7、His-2: 図4、配列番号8)を同量ずつ混合し、65℃、30分処理後、同液を30分から1時間かけて徐々に室温に戻るようアニーリング処理を行い、このDNAを先に得た4.0kbpの遺伝子断片とT4DNAリガーゼを用いて連結した。

【0027】連結DNAを用いてプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-S5 (FERM BP-6623)をエレクトロポレーション法で形質転換し、ネオマイシン50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有TM寒天培地に塗布をして、ネオマイシン耐性を持つ株を選択した。選択株よりヒスタグ配列を含むプラスミドを抽出、精製し、ここで得たプラスミドをpNH300H3とした。

【0028】(3)プレビバチルス・チョウシネンシスへのクローニング

先に得た精製プラスミドpNH300H3をNcoIとBamHIで処理し、0.8%アガロースゲル電気泳動に供して4.0kbpの断片を回収した。さらに、pT7 Blue pH1212をNcoIとBamHIで処理した後、0.8%アガロースゲル電気泳動に供して441bpのpH1212遺伝子断片を回収し、先に得た4.0kbpの遺伝子断片とT4DNAリガーゼを用いて連結した。

【0029】連結DNAを用いてプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-S5 (FERM BP-6623)をエレクトロポレーション法で形質転換し、ネオマイシン50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有TM寒天培地に塗布をして、ネオマイシン耐性を持つ株を選択した。選択株よりプラスミドを抽出してpH1212遺伝子を保持するプラスミドpNH300 pH1212を得た (図8)。また、ここで得た株をプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-S5/pNH300 pH1212とし、これを工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-18071として寄託した。

【0030】図8に示したパイロコッカス・ホリコシJCM9974株のヌクレアーゼ (PH1212)をコードする441bpの発現用プラスミドの構造において、PromoterとしてはpNH300で機能するプロモーター配列2種 (P2-35及びP2-10)を用

い、SPとしてはプレビバチルス・チョウシネンシスで機能するシグナルペプチド配列 (SP) (図6、配列番号9: なお図6の下段は、それに対応するアミノ酸配列 (配列番号10)を示す)を用い、そして、His-tagとしてはヒスタグ配列 (図7、配列番号11: なお図7の下段は、対応するアミノ酸配列、つまりHis (配列番号12)を示す。)を用いた。

【0031】プロモーターP2-35及びP2-10の塩基配列は、それぞれ、GCAACT及びTTAATであり、図5に示される。

【0032】

(実施例7) 組換え耐熱性酵素遺伝子の発現

上記によって得られた形質転換体プレビバチルス・チョウシネンシス (*Brevibacillus choshinensis*) HPD31-S5/pNH300 pH1212 (FERM P-18071)をネオマイシン50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有TM寒天培地にて30℃で一昼夜培養した。これを前記と同じ組成の液体培地3mLを分注した試験管に接種して30℃で一晩振とう培養を行ったものを前培養液とした。

【0033】500mLの三角フラスコに前培養と同じ組成の生産培地100mLを分注した後、120℃で15分間滅菌し、冷却後、前培養液1mLを接種し、振とう数120rpm、30℃で3日間培養を行った。その培養液を遠心分離 (12,000rpm、5分)し、培養上清を得た。この培養上清についてSDS-PAGE、ウエスタンブロッティングにより解析を行った。ウエスタンブロッティングには抗ヒスタグ抗体 (キアゲン社製)を1次抗体として用いた。プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-S5/pNH300 pH1212培養から得られたヌクレアーゼの推定分子量は約17,000Daであり、該当する分子量の位置に染色バンドを示した。

【0034】得られた結果を図9に示した。図9は、ヌクレアーゼ酵素活性を有する蛋白質 (PH1212)の電気泳動像及びウエスタンブロッティング像の写真であって、前者を左側に示し、後者を右側に示す。図9 (図面代用写真)において、Mはマーカーであって、電気泳動像 (左側)においては、ローマーカー (クマシーブリリアントブルー: CBB)を使用し、ウエスタンブロッティング像 (右側)においては、プレ・ステインマーカーを使用した。なお、aは形質転換体の培養上清を示し、bはヌクレアーゼ遺伝子 (pH1212)を挿入していないプラスミドベクターpNH300H3のみを導入した場合の培養上清を示す。

【0035】(実施例8) 耐熱性酵素の精製

形質転換体 (FERM P-18071)の培養上清液をHiTrapQ (ファルマシア社製)カラムに吸着させ、NaCl濃度勾配による溶出を行い活性画分を得た。さらに得られた活性画分溶液をNi-カラム (Nova gen, His-Bind metal chelation resin & His-Bind buf

fer kitを使用)による親和性クロマトグラムを行った。ここで得られた60mMイミダゾール流出画分をダイアリシスメンブレン(和光純薬)で脱イオン水へと置換し、精製蛋白質を得た。

【0036】(実施例9) 酵素反応条件

(1) 加水分解反応

サケ精子DNA(シグマ社製)を基質として酵素反応を10mM CaCl₂存在下、pH9.5、75℃で行い、反応後にウシ血清アルブミン(和光純薬製)、過塩素酸を順次添加し、260nmにおける吸光度の上昇を測定することによって、DNAの加水分解反応を酸可溶性ヌクレオチドの生成を指標としてモニターした。

【0037】(2) 至適温度と至適pH

サケ精子DNA(シグマ社製)を基質として測定した。至適温度は、50mMグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液(pH9.5)中で反応温度を4℃から95℃まで変化させ、酸可溶性ヌクレオチドの生成による260nm吸光度の上昇を測定した。至適pHは上記測定条件における反応温度を75℃に固定し、酵素反応液のpHをクエン酸緩衝液、MES緩衝液、MOPS緩衝液、Tris緩衝液とグリシン緩衝液を用い4.0から10.0まで変化させ、260nm吸光度の変化量より決定した。

【0038】(3) 熱安定性と有機溶媒中での反応性
熱安定性は加熱後の残存活性測定により解析した。酵素(0.1mg/ml)は100mM NaClを含む50mMグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液(pH9.5)中で、95℃で1時間加熱され、急冷後、75℃の温度条件で測定された。

【0039】有機溶媒中での反応性はサケ精子DNAを基質としてエタノール或いはメタノールを10~40%含む50mMグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液(pH9.5)中で、75℃で所定時間反応させ、DNAの消化を酸可溶性ヌクレオチドの生成としてモニターし、

有機溶媒を含まない上記反応条件での活性を100%として相対活性で表した。

【0040】(1) タンパク質化学的性質

当該酵素は147アミノ酸残基より構成され、その分子量は約17,000Daである。

【0041】(2) 基質特異性

当該酵素は閉環状のファージM13 DNA(宝酒造製)、pUC119(宝酒造製)を分解したことから、エンド型ヌクレアーゼである。また、当該酵素はポリヌクレオチドをカルシウムの濃度依存的に分解したことから、スタフィロコッカルヌクレアーゼ(EC3.1.31.1)に近い性質を有している。

【0042】(3) 至適温度と至適pH

図10に示すようにサケ精子DNAを基質として用いた場合、酵素活性は温度の上昇と共に増加し、至適温度は80℃以上であることが明らかとなった。また、酵素活性の至適pHは9.5であった(図11)。

【0043】(4) 熱安定性と有機溶媒中での反応性

加熱後の残存活性測定において、本酵素は100mM NaClを含む50mMグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液(pH9.5)中で、95℃で1時間加熱しても80%の活性を保持していた。また、当該酵素は20%のエタノール或いはメタノール存在下pH6.0、60℃の反応で溶媒非存在下の各々77%、68%の活性を保持しており、40%濃度でも各々13%、18%の活性を保持していた。以上の事実より当該酵素が極めて高い熱安定性と有機溶媒耐性を示すことが明らかになった。

【0044】

【発明の効果】本発明により、新規な耐熱性ヌクレアーゼが提供された。このヌクレアーゼは、極限環境下でも安定であることから、当該酵素を用いた選択性の高い核酸物質の開発が可能となる。

【0045】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>	Higeta Shoyu Co., Ltd.	
<120>	Protein Having Thermotolerant Nuclease Activity	
<130>	6378	
<141>	2000-11-15	
<160>	12	
<210>	1	
<211>	531	
<212>	DNA	
<213>	Pyrococcus horikoshii	
<400>	1	
	atggtagagt tatttgggag agcaggaaga ttaggaagta gcttactttt aatattactc	60
	ctctccctag gatgtatata ccaatctaaa gagctacatg gtaaggttat caaggtcggtt	120
	gatggggata cgctgtacgt taagcttgat gatggtgaag tagtaaaagt tagactagta	180
	ggggtagacg ccctgagct agaggagggg ctaatgaggc ctggagaata tcctgggatt	240
	cataacatga cgtgcctgat taagtatggg gaactagcta aggagtttct aaaaacata	300

accctaggta aatccgtaac tcttgaattc gattcaattc aaggaaggaa agataaatac 360
 ggacgtttat tgggtgtacat gtatctaaat ggaaccgata ttaatgctga gcttataaaa 420
 atgggatttg caagggtttt ctatgaaaaa agatttgaaa agattaagga atactcaaag 480
 cttgaagatg acgccaggaa aaggaggtta aacttatgga gttgcaattg a 531

<210> 2
 <211> 176
 <212> PRT
 <213> Pyrococcus horikoshii
 <400> 2

Met Val Glu Leu Phe Gly Arg Ala Gly Arg Leu Gly Ser Ser Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Ile Leu Leu Leu Ser Leu Gly cys Ile Ser Gln Ser Lys Glu Leu
 20 25 30
 His Gly Lys Val Ile Lys Val Val Asp Gly Asp Thr Leu Tyr Val Lys
 35 40 45
 Leu Asp Asp Gly Glu Val Val Lys Val Arg Leu Val Gly Val Asp Ala
 50 55 60
 Pro Glu Leu Glu Glu Gly Leu Met Arg Pro Gly Glu Tyr Pro Gly Ile
 65 70 75 80
 His Asn Met Thr Cys Leu Ile Lys Tyr Gly Glu Leu Ala Lys Glu Phe
 85 90 95
 Leu Lys Asn Ile Thr Leu Gly Lys Ser Val Thc Leu Glu Phe Asp Ser
 100 105 110
 Ile Gln Gly Arg Lys Asp Lys Tyr Gly Arg Leu Leu Val Tyr Met Tyr
 115 120 125
 Leu Asn Gly Thr Asp Ile Asn Ala Glu Leu Ile Lys Met Gly Phe Ala
 130 135 140
 Arg Val Phe Tyr Glu Lys Arg Phe Glu Lys Ile Lys Glu Tyr Ser Lys
 145 150 155 160
 Leu Glu Asp Asp Ala Arg Lys Arg Arg Leu Asn Leu Trp Ser Cys Asn
 165 170 175

<210> 3
 <211> 444
 <212> DNA
 <213> Pyrococcus horikoshii
 <400> 3

aaagagctac atggttaaggt tatcaagggtc gttgatgggg atacgctgta cgtaaagctt 60
 gatgatgggtg aagtagtaaa ggtagacta gtaggggtag acgcccctga gctagaggag 120
 gggctaataa ggcctggaga atactctggg attcataaca tgacgtgcct gattaagtat 180
 ggggaactag ctaaggagtt tctaaaaaac ataaccctag gtaaatccgt aactcttgaa 240
 ttcgattcaa ttcaaggaag gaaagataaa tacggacgtt tattggtgta catgtatcta 300
 aatggaaccg atattaatgc tgagcttata aaaatgggat ttgcaagggt tttctatgaa 360
 aaaagatttg aaaagattaa ggaatactca aagcttgaag atgacgccag gaaaaggagg 420
 ttaaacttat ggagttgcaa ttga 444

<210> 4
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Pyrococcus horikoshii
 <400> 4

Lys Glu Leu His Gly Lys Val Ile Lys Val Val Asp Gly Asp Thr Leu

1	5	10	15
Tyr Val Lys Leu Asp Asp Gly Glu Val Val Lys Val Arg Leu Val Gly			
20	25	30	
Val Asp Ala Pro Glu Leu Glu Glu Gly Leu Met Arg Pro Gly Glu Tyr			
35	40	45	
Pro Gly Ile His Asn Met Thr Cys Leu Ile Lys Tyr Gly Glu Leu Ala			
50	55	60	
Lys Glu Phe Leu Lys Asn Ile Thr Leu Gly Lys Ser Val Thr Leu Glu			
65	70	75	80
Phe Asp Ser Ile Gln Gly Arg Lys Asp Lys Tyr Gly Arg Leu Leu Val			
85	90	95	
Tyr Met Tyr Leu Asn Gly Thr Asp Ile Asn Ala Glu Leu Ile Lys Met			
100	105	110	
Gly Phe Ala Arg Val Phe Tyr Glu Lys Arg Phe Glu Lys Ile Lys Glu			
115	120	125	
Tyr Ser Lys Leu Glu Asp Asp Ala Arg Lys Arg Arg Leu Asn Leu Trp			
130	135	140	
Ser Cys Asn			
145			
<210>	5		
<211>	41		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<400>	5		
gggccatggc	tttcgctaaa gagctacatg gtaaggttat c		41
<210>	6		
<211>	32		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<400>	6		
gggggatcca	ttgcaactcc ataagtttaa cc		32
<210>	7		
<211>	53		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<400>	7		
gatccgaatt	ccccgggaag cttcaccatc accatcacca tcaccattaa tag		53
<210>	8		
<211>	53		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<400>	8		
agctctatta	atggtgatgg tgatggtgat ggtgaagctt cccggggaat tcg		53
<210>	9		
<211>	90		
<212>	DNA		
<213>	Brevibacillus choshinensis		
<400>	9		
atgaaaaaaa	gaagggtcgt taacagtgtg ttgcttctgc tactgctagc tagtgcactc		60
gcacttactg	ttgctcccat ggctttcgct		90


```

<210>      10
<211>      30
<212>      PRT
<213>      Brevibacillus choshinensis
<400>      10
Met Lys Lys Arg Arg Val Val Asn Ser Val Leu Leu Leu Leu Leu
  1              5              10              15
Ala Ser Ala Leu Ala Leu Thr Val Ala Pro Met Ala Phe Ala
              20              25              30

<210>      11
<211>      30
<212>      DNA
<213>      Artificial Sequence
<400>      11
caccatcacc atcaccatca ccattaatag
<210>      12
<211>      24
<212>      PRT
<213>      Artificial Sequence
<400>      12
His His His His His His His His

```

【図面の簡単な説明】

【図1】パイロコッカス・ホリコシJCM9974株のヌクレアーゼ遺伝子（531bp）のヌクレオチド配列（上段）とアミノ酸配列（下段）を示す。

【図2】パイロコッカス・ホリコシJCM9974株のヌクレアーゼ活性を持つPH1212をコードする444bpのヌクレオチド配列（上段）とアミノ酸配列（下段）を示す。

【図3】パイロコッカス・ホリコシJCM9974株のヌクレアーゼをコードする441bpのポリヌクレオチドのPCRクローニング用プライマー（PH1212N、PH1212C）を示す。

【図4】pNH300のBamHIとHindIII部位にヒスタグ配列を含むリンカーDNAを挿入する目的で、上流末端にBamHI部位を下流末端にHindIII部位を形成するためのヒスタグ配列を含む合成DNA 2種（His-1、His-2）を示す。

【図5】パイロコッカス・ホリコシJCM9974株のヌクレアーゼ活性を持つPH1212をコードする441bpの発現用プラスミドpNH300 ph1212におけるプロモーターであって、pNH300で機能す

る2種のプロモーター（P2-35及びP2-10）の配列を示す。

【図6】上記発現用プラスミドにおけるシグナルペプチド（SP）であって、プレビバチルス・チョウシネンシスで機能するSP配列を上段に示し、その塩基配列に対応するアミノ酸配列を下段に示す。

【図7】上記発現用プラスミドにおけるヒスタグ（His-tag）配列であって、その塩基配列を上段に示し、それに対応するアミノ酸配列を下段に示す。

【図8】パイロコッカス・ホリコシJCM9974株のヌクレアーゼ活性を持つPH1212をコードする441bpの遺伝子DNAの発現用プラスミドの構造を示す。

【図9】パイロコッカス・ホリコシJCM9974株のヌクレアーゼ活性を持つPH1212をコードする441bpで組換えたプレビバチルス・チョウシネンシスにより生産されたPH1212の電気泳動像（左側）及びウエスタンブロッティング像（右側）を示す図面代用写真である。

【図10】本発明の酵素の活性の至適温度を示す。

【図11】本発明の酵素の活性の至適pHを示す。

【図5】

Promoter :

```

P2-35      GCAACT
P2-10      TTAAT

```

【図1】

1 ATG GTA GAG TTA TTT GGG AGA GCA GGA AGA TTA GGA AGT AGC TTA CTT TTA ATA TTA CTC
Met Val Glu Leu Phe Gly Arg Ala Gly Arg Leu Gly Ser Ser Leu Leu Leu Ile Leu Leu

61 CTC TCC CTA GGA TGT ATA TCC CAA TCT AAA GAG CTA CAT GGT AAG GTT ATC AAG CTC GTT
Leu Ser Leu Gly Cys Ile Ser Gln Ser Lys Glu Leu His Gly Lys Val Ala Lys Val Val

121 GAT GGG GAT ACG CTG TAC GTT AAG CTT GAT GAT GGT GAA GTA GTA AAG GTT AGA CTA GTA
Asp Gly Asp Thr Leu Tyr Val Lys Leu Asp Asp Gly Glu Val Val Lys Val Arg Leu Val

181 GGG GTA CAC GCC CTT GAG CTA GAG GAG GGG CTA ATG AGG CCT GGA GAA TAT CCT GGG ATT
Gly Val Asp Ala Pro Glu Leu Glu Glu Gly Leu Met Arg Pro Gly Glu Tyr Pro Gly Ile

241 CAT AAC ATG ACG TCC CTG ATT AAG TAT GGG GAA CTA GCT AAG GAG TTT CTA AAA AAC ATA
His Asn Met Thr Cys Leu Ile Lys Tyr Gly Glu Leu Ala Lys Glu Phe Leu Lys Asn Ile

301 ACC CTA GGT AAA TCC GTA ACT CTT GAA TTC GAT TCA ATT CAA GGA AGG AAA GAT AAA TAC
Thr Leu Gly Lys Ser Val Thr Leu Glu Phe Asp Ser Ile Gln Gly Arg Lys Asp Lys Tyr

361 GGA CGT TTA TTG GTG TAC ATG TAT CTA AAT GGA ACC GAT ATT AAT GCT GAC CTT ATA AAA
Gly Arg Leu Leu Val Tyr Met Tyr Leu Asn Gly Thr Asp Ile Asn Ala Glu Leu Ile Lys

421 ATG GGA TTT GCA AGG CTT TTC TAT GAA AAA AGA TTT GAA AAG ATT AAG GAA TAC TCA AAG
Met Gly Phe Ala Arg Val Phe Tyr Glu Lys Arg Phe Glu Lys Ile Lys Glu Tyr Ser Lys

481 CTT GAA GAT GAC GCC ACG AAA AGG AGG TTA AAC TTA TGG AGT TGC AAT TGA 531
Leu Glu Asp Asp Ala Arg Lys Arg Arg Leu Asn Leu Trp Ser Cys Asn ***

【図7】

His-Tag :
CAC CAT CAC CAT CAC CAT CAC CAT TAA TGA
TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA TAA ...

【図2】

1 AAA GAG CTA CAT GGT AAC GTT ATC AAG GTC GTT GAT GGG GAT ACG CTG TAC GTT AAG CTT
Lys Glu Leu His Gly Lys Val Ile Lys Val Val Asp Gly Asp Thr Leu Tyr Val Lys Leu

61 GAT GAT GGT GAA CTA GTA AAG CTT AGA CTA GTA GGG GTA GAC GCC CCT GAG CTA GAG GAG
Asp Asp Gly Glu Val Val Lys Val Arg Leu Val Gly Val Asp Ala Pro Glu Leu Glu Glu

121 GGG CTA ATG AGG CCT GGA GAA TAT CCT GGG ATT CAT AAC ATG ACG TGC CTG ATT AAG TAT
Gly Leu Met Arg Pro Gly Glu Tyr Pro Gly Ile His Asn Met Thr Cys Leu Ile Lys Tyr

181 GGG GAA CTA GCT AAG GAG TTT CTA AAA AAC ATA ACC CTA GGT AAA TCC CTA ACT CTT GAA
Gly Glu Leu Ala Lys Glu Phe Leu Lys Asn Ile Thr Leu Gly Lys Ser Val Thr Leu Glu

241 TTC GAT TCA ATT CAA GGA AGG AAA GAT AAA TAC GGA CGT TTA TTG GTG TAC ATG TAT CTA
Phe Asp Ser Ile Gln Gly Arg Lys Asp Lys Tyr Gly Arg Leu Leu Val Tyr Met Tyr Leu

301 AAT GGA ACC GAT ATT AAT GCT GAG CTT ATA AAA ATG GGA TTT GCA AGG GTT TTC TAT GAA
Asn Gly Thr Asp Ile Asn Ala Glu Leu Ile Lys Met Gly Phe Ala Arg Val Phe Tyr Glu

361 AAA AGA TTT GAA AAG ATT AAG GAA TAC TCA AAG CTT GAA GAT GAC GCC AGG AAG AGG AGG
Lys Arg Phe Glu Lys Ile Lys Glu Tyr Ser Lys Leu Glu Asp Asp Ala Arg Lys Arg Arg

421 TTA AAC TTA TGG AGT TGC AAT TGA 444
Leu Asn Leu Trp Ser Cys Asn ***

【図3】

Upper primer (PH1212N) :

5'-GGGCCATGGCTTTCCGCTAAAGAGCTACATGGTAAGGTTATC-3'

Lower primer (PH1212C) :

5'-GGGGGATCCATTGCAACTCCATAAGTTTAACC-3'

【図4】

His-1 :
 5'-GATCCGAATTCCCCGGGAAGCTTCACCATCACCATCACCATCACCATTAATAG
 -3'

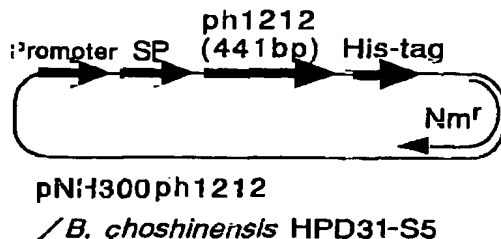
His-2 :
 5'-AGCTCTATTAATGGTGATGGTGATGGTCATGGTGAAGCTTCCCCGGGAATTCG
 -3'

【図6】

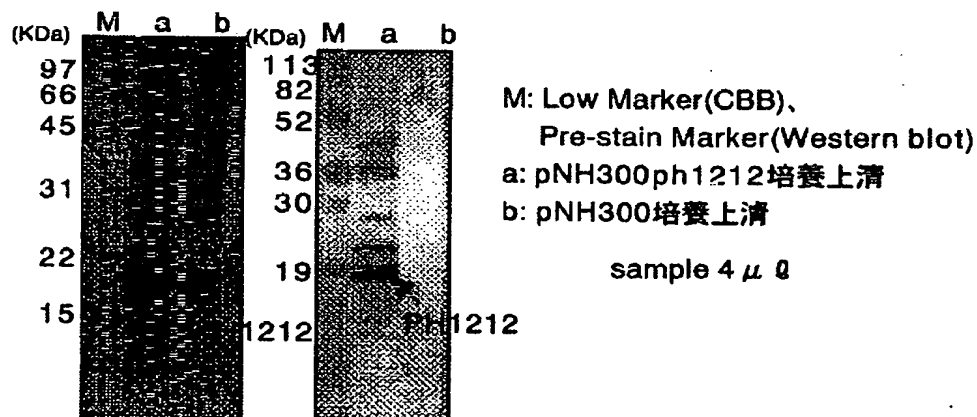
SP :
 ATG AAA AAA AGA AGG GTC GTT AAC AGT GTA TTG CTT CTG CTA CTG CTA GCT AGT GCA CTC
 Met Lys Lys Arg Arg Val Val Asn Ser Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ser Ala Leu

GCA CTT ACT GTT GCT CCC ATG GCT TTC GCT
 Ala Leu Thr Val Ala Pro Met Ala Phe Ala

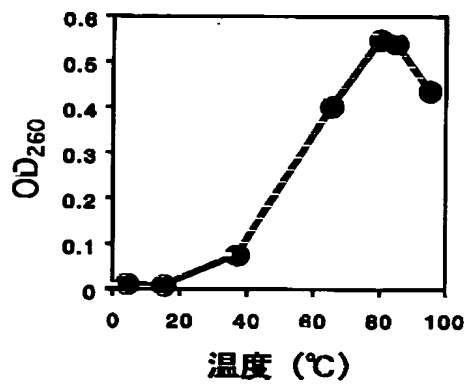
【図8】



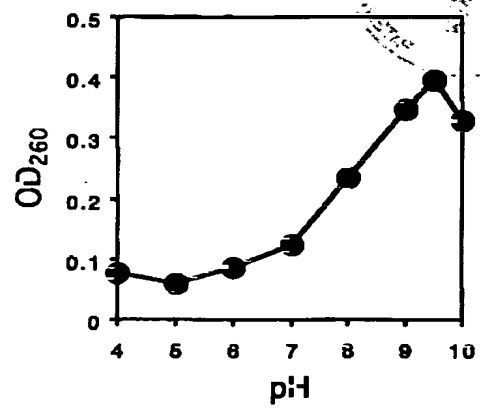
【図9】



【図10】



【図11】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA03 BA11 CA01 CA03 DA06
EA04 FA02 FA18 GA14 GA19
4B050 CC03 DD02 FF14E LL05
4B065 AA15X AA26X AB01 AC14
AC15 BA03 BD15 CA31 CA60